

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA PROPIEDAD INTELECTUAL Oficina Internacional



(51) Clasificación Internacional de Patentes ⁶:

G01R 33/48, A61B 5/055

(11) Número de publicación internacional:

WO 98/39664

(43) Fecha de publicación internacional:

11 de Septiembre de 1998 (11.09.98)

(21) Solicitud internacional:

PCT/ES98/00045

A1

(22) Fecha de la presentación internacional:

26 de Febrero de 1998 (26.02.98)

(30) Datos relativos a la prioridad:

P 9700496

6 de Marzo de 1997 (06.03.97) E

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo US):

UNIVERSIDAD NACIONAL DE EDUCACION A
DISTANCIA [ES/ES]; Calle Bravo Murillo, 38-4* Pta.,
E-28015 Madrid (ES). CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS [ES/ES]; Calle Serrano, 117,
E-28006 Madrid (ES). THE UNIVERSITY OF ARIZONA
[US/US]; 888 North Euclid Avenue 515, Tucson, AZ
85721-0158 (US). THE JOHNS HOPKINS SCHOOL
OF MEDICINE [US/US]; 888 North Euclid Avenue 515,
Tucson, AZ 85721-0158 (US).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/solicitantes (sólo US): BALLESTEROS GARCIA, Paloma [ES/ES]; Universidad Nacional de Educación a Distancia, Calle Bravo Murillo, 38-4º Pta., E-28015 Madrid (ES). GIL CONZALEZ, Mº Soledad [ES/ES]; Universidad Nacional de Educación a Distancia, Calle Bravo Murillo, 38-4º Pta., E-28015 Madrid (ES). ZADERENKO PAR- TIDA, Paula [ES/ES]; Universidad Nacional de Educación a Distancia, Calle Bravo Murillo, 38-4ª Pta., E-28015 Madrid (ES). CERDAN GARCIA-ESTELLER, Sebastián [ES/ES]; Insto. Investigaciones Biomédicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Calle Arturo Duperier, 4, E-28029 Madrid (ES). ALVAREZ PEREZ, Jose [ES/ES]; Insto. Investigaciones Biomédicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Calle Arturo Duperier, 4, E-28029 Madrid (ES). GILLIES, Robert, J. [US/US]; The University of Arizona, 888 North Euclid Avenue 515, Tucson, AZ 85721-0158 (US). NATARAJAN, Raghunand [US/US]; The University of Arizona, 888 North Euclid Avenue 515, Tucson, AZ 85721-0158 (US). VAN SLUIS, Robert [US/US]; The University of Arizona, 888 North Euclid Avenue 515, Tucson, AZ 85721-0158 (US). BHUJWALA, Zaver [US/US]; The Johns Hopkins School of Medicine, 888 North Euclid Avenue 515, Tucson, AZ 85721-0158 (US).

- (74) Mandatario: OJEDA GARCIA, Pedro; Calle Serrano, 113, E-28006 Madrid (ES).
- (81) Estados designados: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, Patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), Patente euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Patente europea (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada

Con informe de búsqueda internacional.

- (54) Title: PROCESS FOR OBTAINING IMAGES AND SPECTRA OF THE EXTRACELLULAR pH BY MAGNETIC RESONANCE WITH EXTRINSINC INDICATORS CONTAINING ¹H OR ¹⁹F
- (54) Título: PROCEDIMIENTOS PARA LA OBTENCION DE IMAGENES Y ESPECTROS DEL pH EXTRACELULAR POR RESONANCIA MAGNETICA CON INDICADORES EXTRINSECOS CONTENIENDO ¹H O ¹⁹F

(57) Abstract

The process comprises obtaining an image or spectrum MR having any characteristic or MR sensitive to the pH of molecules impervious to the membering. Normally, the chemical displacement of a nucleous located in or at the vicinity of a ionisable group of a non permeating molecule is used as "pH informating resonance" in the extracellular space. Various MR methods (chemical displacement selective image (CSIC) or spectroscopic image (SL)) enable to determine the distribution in the space of the "informational resonance" and therefore the distribution of the extracellular pH in the sample. Said information is useful for example in clinical situations such as muscular dystrophies, ischemia, tumoral transformation and metastases.

(57) Resumen

El abordaje consiste en la obtención de una imagen o espectro MR de cualquier propiedad de MR sensible al pH de moléculas impermeables a la membrana. Normalmente se utiliza el desplazamiento químico de un núcleo localizado en, o en la proximidad de, un grupo ionizable de una molécula no permeante como "resonancia informadora del pH" en el espacio extracelular. Varios métodos de MR (CSIC-imagen selectiva del desplazamiento químico o SL-imagen espectroscópica) permiten la determinación de la distribución en el espacio de la "resonancia informadora", y por tanto la distribución del pH extracelular en la muestra. Esta información resulta útil, entre otras, en situaciones clínicas como las distrofias musculares, la isquemia, la transformación tumoral y las metástasis.

UNICAMENTE PARA INFORMACION

Códigos utilizados para identificar a los Estados parte en el PCT en las páginas de portada de los folletos en los cuales se publican las solicitudes internacionales en el marco del PCT.

AL	Albania	ES	España	LS	Lesotho	SI	Eslovenia
AM	Armenia	FI	Finlandia	LT	Lituania	SK	Eslovaquia
AT	Austria	FR	Francia	LU	Luxemburgo	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabón	LV	Letonia	SZ.	Swazilandia
AZ	Azerbaiyán	GB	Reino Unido	MC	Mónaco	TD	Chad
BA	Bosnia y Herzegovina	GE	Georgia	MD	República de Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tayikistán
BE	Bélgica	GN	Guinea	MK	Ex República Yugoslava de	TM .	Turkmenistán
BF	Burkina Faso	GR	Grecia		Macedonia	TR	Turquía
BG	Bulgaria	HU	Hungria	ML	Malí	TT	Trinidad y Tabago
ВJ	Benin	IE	Irlanda	MN	Mongolia	UA	. Ucrania
BR	Brasil	IL	Israel	MR	Mauritania	UG	Uganda
BY	Belards	IS	Islandia	MW	Malawi	US	Estados Unidos de América
CA	Canadá	ĬΤ	Italia	MX	Méxi∞	UZ	Uzbekistán
CF	República Centroafricana	JP	Japón	NE	Níger	· VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Países Bajos	YU	Yugoslavia
CH	Suiza	KG	Kirguistán	NO	Noruega	zw	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	República Popular	NZ	Nueva Zelandia		
СМ	Camerún		Democrática de Corea	PL	Polonia		
CN	China	KR	República de Corea	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakstán	RO	Rumania		
CZ	República Checa	LC	Santa Lucía	·RU	Federación de Rusia		
DE	Alemania	LI	Liechtenstein	SD	Sudán .		
DK	Dinamarca	LK	Sri Lanka	SE	Suecia		
EE	Estonia	LR	Liberia	SG	Singapur		·

TÍTULO

PROCEDIMIENTOS PARA LA OBTENCIÓN DE IMAGENES Y ESPECTROS DEL pH EXTRACELULAR POR RESONANCIA MAGNÉTICA CON INDICADORES EXTRÍNSECOS CONTENIENDO ¹H Ó ¹⁸F.

5

SECTOR DE LA TÉCNICA

- Medicina Física.
- Sector Farmacéutico.
- Investigación Biomédica.

10

15

20

25

30

• Diagnóstico por imagen.

ESTADO DE LA TÉCNICA

Las aplicaciones biomédicas de la Resonancia Magnética (MR) han experimentado un gran desarrollo en las últimas décadas (Andrew, E.R., Bydder, G., Griffiths, J., Iles, R. y Styles, P. Eds. (1990) Clinical Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy. John Wiley and Sons. New York). Se han utilizado tanto la Espectroscopia (MRS) como la Imagen (MRI) por Resonancia Magnética para estudiar no invasivamente procesos fisiológicos y patológicos en animales y seres humanos (Gillies, R.J. Ed. (1994) NMR in Physiology and Biomedicine, Academic Press, New York). También ha sido posible extender las aplicaciones de la MR a estudios sobre la fisiología y patología al nivel celular (Gillies, R.J., Gallons, J.P., McGovern, K.A., Scherrer, P.G., Lien, Y.H., Job, C., R., Chapa, F., Cerdán, S. y Dale, B.E. (1993) NMR in Biomedicine 6,95-104). Tomados en su conjunto, estos avances han hecho posible estudiar por MR, de una manera integrada, algunos aspectos fundamentales de la Biología y la Medicina, incluyendo la proliferación y diferenciación celular y la transformación tumoral. Estos procesos ocurren con cambios concomitantes en el pH intra y extracelular. Adicionalmente, el pH es una variable fisiológica crucial en otros procesos fundamentales como el ejercicio y la fatiga muscular, el control metabólico y la transducción del mensaje.

hormonal (Roos, A. y Boron, W.F. (1981) Physiol. Rev 61,296-696).

5

10

15

20

25

30

La concentración de protones intracelulares es el resultado del balance entre los procesos de producción y consumo intracelular de protones, la captación o extrusión de protones al medio extracelular y la capacidad de tamponamiento intracelular (Moldes, M., Cruz, F., Chapa, F. y Cerdán, F. y Cerdán S. (1995) Quart. Mag. Res, in Biol. Med. 2,5-17). Dado que esta ultima es normalmente constante, un aumento en la producción de protones intracelulares se puede compensar por la extrusión de ácido ó captación de base del medio extracelular y un aumento en la producción intracelular de base se podría compensar por el mecanismo opuesto. Por tanto, cambios en el pH extracelular reflejan normalmente modificaciones en el pH intracelular y las medidas del pH extracelular proporcionan una herramienta muy útil para monitorizar alteraciones en la homeostasis del pH intracelular.

Los métodos disponibles actualmente para la determinación del pH en muestras biológicas incluyen métodos potenciométricos (electrodos de pH), técnicas radiométricas, métodos ópticos y abordajes de Resonancia Magnética (Henderson, R.M. y Graf, J (1988) In pH Homeostasis: Mechanisms and Control (Häussinger, D. Ed.) Academic Press, pg 5-26). La utilización de una sonda molecular impermeable a la membrana, ya sea radioactiva, cromófora, fluorescente, fosforescente ó activa en MR permite a cualquiera de estos métodos medir exclusivamente el pH extracelular. Sin embargo, entre la variedad de los métodos disponibles, tan sólo la MR permite la obtención de imagenes no invasivas de la totalidad del volumen tridimensional de muestras ópticamente opacas. Estas características hacen de la MR el método de elección para la determinación no invasiva del pH extracelular en especímenes biológicos. En esta patente describimos el uso y aplicaciones de una nueva serie de moléculas indicadoras que permiten la determinación del pH intracelular y el pH extracelular por métodos de MRS y MRI.

Los abordajes previos han utilizado principalmente ³¹P MRS y el desplazamiento químico del fosfato inorgánico para la medida del pH intracelular en

15

20

suspensiones celulares, órganos perfundidos, tejidos, animales intactos o

incluso seres humanos (Moon, R.B. y Richards, J.H. (1973) j. Biol. Chem 248, 7276-7278). Una variante de este método ha permitido medir exclusivamente el pH extracelular por 1D-31P MRS en suspensiones de células utilizando fosfonatos impermeables a la membrana plasmática (Gillies, R.J., Liu, Z. Y Bhuiwalla, Z. (1994) Am.J.Physiol. 267, C195-C203). Por otro lado, se han propuesto técnicas de ³¹P MRS localizada que permiten obtener espectros de ³¹P RMN de una región espacial especificada (voxel) dentro de un animal intacto, y así determinar por el desplazamiento químico del Pi, el pH intracelular promedio en la región seleccionada (Aue, W.P. (1986) Rev. Mag. Res. Med. 1:21-72; Ordidge, R.J., Connelly, A. y Lohman, J.A.B. (1986) J. Mag. Res. 66:283-294; Frahm, J., Bruhn, H., Gyngell, M.N.L., Merboldt, K.D., Hanike, W. Y Sauter, R (1989) Mag. Res. Med. 9:79-93). También se han desarrollado metodologías de imagen multivoxel por 31P MRS. Estas técnicas permiten obtener simultáneamente, espectros de ³¹P RMN de una colección de voxels adyacentes que cubren completamente el volumen tridimensional del espécimen, proporcionando así, mapas tridimensionales de la distribución del pH a través de la muestra (Brown, T.R., Kincaid, B.M. y Ugurbil, K. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 79:3523-3526; Maudsley, A.A., Hilal, S.K., Perman, W.H. y Simon, H.E. (1983). J. Mag. Res. 66:283-294; Vigneron, D.B., Nelson, S.J., Nat, R. Murphy-Boesch, J., Kelley, D.A.C., Kessler, H.B., Brown, T.R. y Taylor, J.S. (1990) Radiology 177:643-649; Shungu, D.C. y Glickson, J.D. (1994) Mag. Res. in Med. 32, 277-84; Shungu, D.C. y Glickson, J.D. (1993) Mag. Res. in Med. 30, 661 -71). A pesar de estos progresos, la aplicación de los métodos de ³¹P MRS para la

A pesar de estos progresos, la aplicación de los metodos de P MRS para la determinación del pH ha estado tradicionalmente limitada por la baja sensibilidad del núcleo de ³¹P. Así, los métodos de ³¹P MRS requieren tiempos de adquisición largos y tamaños de voxel grandes para obtener una adecuada relación señal/ruido. Estas dos circunstancias reducen significativamente la resolución temporal y espacial de la medida de pH por ³¹P MRS. Ambas

10

15

4

limitaciones se pueden aliviar mediante el uso de ¹H ó ¹⁹F, dos núcleos inherentemente más sensibles en MR que ³¹P (Gadian, D.G. (1982) Nuclear Magnetic Resonance and its applications to living systems. Oxford University Press, pg 8). Este aumento de sensibilidad de ¹H (¹⁹F) MRS frente a ³¹p MRS permitiria obtener espectros o imagenes 1-D, 2-D ó 3-D, similares a los de ³¹P en señal/ruido, pero 4(3), 16(12), ó 64(43) veces más rápido que con ³¹P MRS. También se podría obtener, utilizando ¹H (¹⁹F) MRS una reducción significativa del tamaño de voxel empleado en adquisiciones con ³¹P MRS, manteniendo las mismás condiciones de señal/ruido. Sin embargo, la presencia de metabolitos intrínsecos conteniendo resonancias de ¹H apropiadas es excepcional (Yoshizaki, K., Seo, Y. y Nishikawa, H. (1981) Biochim. Biophys Acta. 678, 283-291) y no existen naturalmente metabolitos conteniendo ¹⁹F. Estas circunstancias hacen indispensable el uso de sondas extrínsecas conteniendo núcleos de ¹H (Rabenstein, D.L. e Isab, A. (1982) *Anal. Biochem.* 121, 423) ó ¹⁹F (Deutsch, C., Taylor, J.S. v Wilson, D.F. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A., 79, 7944) sensibles al pH para poder implementar con éxito las técnicas de ¹H ó ¹⁹F MRS ó MRI en la medida del pH intracelular.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN.

Algunos de nosotros hemos descrito recientemente la síntesis de una nueva serie de indicadores para la medida del pH intracelular, pH extracelular y volumen celular por ¹H RMN en suspensiones celulares (Gil, M.S., Cruz, F., Cerdan, S. y Ballesteros, P. (1992) Bioorg. Med. Chem. Lett. 2, 1117-1722; Gil, M.S., Zaderenko, P., Cruz, F., Cerdan, S. y Ballesteros, P. (1994) Bioorg. Med. Chem. 2, 305-14; Zaderenko, P., Gil, M.S., Ballesteros, P. y Cerdan, S. (1994) J. Org. Chem. (1994) 59,6268-73). En esta patente, se describen algunas propiedades farmacológicas y toxicológicas de estas moléculas útiles para su empleo como indicadores de pH en cultivos celulares y animales enteros y se demuestran los procedimientos de obtención de imagenes del pH tanto *in vitro* en sistemás modelo como *in vivo* en ratones portadores de tumores RIF-1. La

10

30

utilización de estos nuevos indicadores en conjunción con tecnologías de ¹H MR como la imagen de desplazamiento químico (CSI) o la imagen espectroscópica (SI) permiten una disminución considerable en los tiempos de adquisición y un aumento significativo en la resolución de las medidas de pH en comparación con los métodos previos basados en la utilización de ³¹P MR.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN.

El esquema 1 muestra las estructuras de algunas moléculas indicadoras útiles en medidas del pH por 1 H MRS. Los compuestos más relevantes como sondas permeables para la medida simultánea del pH intra- y extracelular son; el imidazol (1, $R^1=R^2=H$) y el ácido imidazol-1-ilacético (4, $R^1=R^2=H$), y como sonda no permeable para medidas del pH extracelular; el ácido (\pm)-3-(etoxicarbonil)-2-imidazol-1-ilpropiónico (9, $R^1=R^2=H$).

Esquema 1. R¹ y R² se refieren a hidrógeno o a cualquier sustituyente alquilo conteniendo o no ¹9F. R se refiere a cualquier sustituyente alquilo.

15

20

25

30

La preparación y propiedades RMN de algunas de estas moléculas se han descrito en detalle previamente (Gil, M.S., Cruz, F., Cerdan, S. y Ballesteros, P. (1992) Bioorg. Med. Chem. Lett. 2, 1117-1722; Gil, M.S., Zaderenko, P., Cruz, F., Cerdan, S. y Ballesteros, P. (1994) Bioorg. Med. Chem. 2, 305- 14; Zaderenko, P., Gil, M.S., Ballesteros, P. y Cerdan, S. (1994) J. Org. Chem. (1994) 59,6268-73). En general, la medida del pH se basa en la determinación del desplazamiento químico del protón H2 de estos compuestos que actúa como "resonancia informadora" en el medio biólogico y su comparación con el desplazamiento químico del protón H2 del mismo compuesto en soluciónes modelo de pH conocido. La Figura 1 muestra la dependencia del desplazamiento químico del protón H2 del compuesto 9 (R1=R2=H, R=Et) con el pH. Una extensión de este procedimiento consite en obtener imagenes MR del protón H2. Estas imagenes se pueden obtener por medio de una excitación selectiva de H2 y posterior codificación en imagen (métodos de desplazamiento químico-CSI) ó mediante la excitación no selectiva de todo el espectro de protón en diversos voxels contiguos que cubren toda la muestra (métodos de imagen espectroscópica-SI). Ambos métodos revelan la distribución espacial de la resonancia H2 de estos compuestos en la muestra y por tanto la distribución del pH.

En esta invención, describimos la utilización de estos compuestos para la obtención de imagenes y espectros de ¹H RMN que revelan el pH extracelular en diversos sistemás biológicos; incluyendo orgánulos subcelulares y células aisladas ó cultivadas de animales o plantas, órganos perfundidos, animales intactos y seres humanos. Estos dos últimos aspectos en particular requieren una exploración de la toxicidad y farmacocinética de estos compuestos así como una demostración fehaciente de la eficacia de los procedimientos de obtención de imagenes de pH *in vitro* e *in vivo*. Esta patente describe; 1) las propiedades toxicológicas de algunas sondas útiles de pH extracelular 2) las cinéticas de distribución en sangre e incorporación a tejidos del compuesto menos tóxico de esta nueva serie y 3) los procedimientos *in vitro* e *in vivo* de imagen MR de

WO 98/39664 PCT/ES98/00045

7

desplazamiento químico (CSI) e imagen espectroscópica (SI) que permiten obtener imagenes MR del pH extracelular en muestras modelo y en ratones portadores de tumores RIF-1.

5 ESTUDIOS DE TOXICIDAD EN CULTIVOS CELULARES Y RATONES.

La toxicidad de los compuestos 5 (R¹=R²=H, R=Et), 6 (R¹=R²=H) y 9 (R¹=R²=H. R=Et) se determinó en cultivos celulares utilizando el siguiente procedimiento. Se crecieron fibroblastos de ratón NIH 3T3 en el medio esencial de cultivo modificado por Dulbecco (DMEM) suplemetado con 10% de suero bovino fetal (FCS, Hyclone, Logan, Utah, USA). Una vez alcanzada la confluencia, se añadieron al medio de cultivo los compuestos 5 (R¹=R²=H, R=Et), 6 (R¹=R²=H) y 9 (R¹=R²=H, R=Et) en un intervalo de concentraciones de 0 a 20mM. Después de 72h de incubación, se determinó el número de células supervivientes en el cultivo mediante el método de Gillies y cols. (Gillies, R.J., Didier, N. y Denton, M. (1986) Anal. Biochem. 159:109-113). Los resultados se presentan en la Tabla 1. El compuesto 9 (R1=R2=H, R=Et) no resultó tóxico, puesto que los números de células viables en presencia de 20 mM 9 (R1=R2=H, R=Et), no fueron significativamente diferentes del control (0 mM). Sin embargo, el compuesto 5 (R1=R2=H, R=Et) mostró una fuerte toxicidad, induciendo muerte celular casi completa en concentraciones de 15 mM (DL₅₀ 6,8 mM). Finalmente, el compuesto 6 (R1=R2=H) mostró una toxicidad moderada, con una reducción significativa del número de células viables observable tan solo en la concentración más alta de 20 mM.

10

15

20

15

20

Tabla 1. Efecto de concentraciones crecientes de los compuestos 5 ($R^1=R^2=H$, R=Et), 6 ($R^1=R^2=H$) and 9 ($R^1=R^2=H$, R=Et) en la superviverncia celular.

Concentrac	Compuesto	Compuesto	Compuesto
ión	5 (R ¹ =R ² =H,	6 (R ¹ =R ² =H)	9 (R ¹ =R ² =H,
(m M)	R=Et)		R=Et)
0,0	1,54±0,04	1,39±0,31	1,65±0,12
1,0	1,52±0,10	1,50±0,22	1,68±0,04
5,0	1,02±0,08	1,34±0,11	1,38±0,06
10,0	0,37±0,08	1,40±0,14	1,52±0,13
15,0	0,27±0,01	1,29±0,13	1,60±0,13
20,0	0,20±0,05	1,10±0,06	1,54±0,09

Las determinaciones de supervivencia celular se llevaron a cabo midiendo la densidad óptica media (una medida del número de células) (Gillies, R.J., Didier, N. y Denton, M. (1986) *Anal. Biochem.* 159:109-113). como se indica en la ref. 24. Los resultados son media±SD de determinaciones en cuatro placas distintas por cada concentración.

Tambien se determino la toxicidad (LD₅₀) de los compuestos 1 (R¹=R²=H), 4 (R¹=R²=H) y 9 (R¹=R²=H, R=Et) en animales enteros. Estos resultados aparecen recogidos en la Tabla 2. Se inyectaron intraperitonealmente 1 (R¹=R²=H), 4 (R¹=R²=H) y 9 (R¹=R²=H, R=Et) en ratones machos Swiss albino (30-40 g peso corporal) en dosis crecientes de hasta 3g/Kg peso corporal. Se utilizaron al menos siete dosis diferentes para cada compuesto administradas a seis ratones por cada dosis, colocando los seis ratones correspondientes a cada dosis en jaulas independientes. La LD₅₀ se determinó una semana después de la inyección mediante el metodo de Miller and Tainter (Vallette, G. (1966) Manual of Pharmacodynamics. Másson et Cie, Eds. Paris, VIº, pg 70). El compuesto 9 (R¹=R²=H, R=Et) que es, por sus propiedades RMN y su comportamiento en suspensiones de eritrocitos, un indicador muy útil del pH

10

15

20

25

extracelular, no resultó tóxico hasta dosis de 3 g/Kg peso corporal, y se observó un comportamiento similar en el compuesto 4 ($R^1=R^2=H$). El compuesto 1 ($R^1=R^2=H$) resultó tóxico en el rango de concentraciones ensayadas, pero con una DL₅₀ relativamente alta. Por tanto el compuesto 9 ($R^1=R^2=H$, R=Et) presenta propiedades toxicológicas muy apropidas para su utilización como molécula indicadora del pH extracelular en animales y seres humanos.

Tabla 2. Valores de LD₅₀ para los compuestos 1 ($R^1=R^2=H$), 4 ($R^1=R^2=H$) y 9 ($R^1=R^2=H$, R=Et).

Compuesto	LD ₅₀ (mg/kg peso corporal)		
1 (R ¹ =R ² =H)	250		
4 (R ¹ =R ² =H)	> 3000		
9 (R ¹ =R ² =H, R=Et)	> 3000		

Las determinaciones de LD₅₀ se llevaron a cabo por el método de Miller y Tainter (Vallette, G. (1966) Manual of Pharmacodynamics. Másson et Cie, Eds. Paris, VI^e, pg 70).

Farmacocinética.

La Figura 2 (paneles A-F) muestra los cambios de concentración de los compuestos 1 (R¹=R²=H) y 9 (R¹=R²=H, R=Et) en el plasma y en diversos tejidos después de la administración de 1 mmol de estos compuestos a ratas adultas. En el experimento que muestra el panel 2A, se inyectaron 0,5 ml de una solución 2M de 1 (R¹=R²=H; pH:7,0) ó 9 (R¹=R²=H, R=Et; pH:7,0) en la vena yugular derecha de ratas macho Wistar (277-312 g peso corporal) y se extrajeron muestras de sangre (0,2 ml) de la vena yugular izquierda, antes de la inyección y después de 1, 5, 10, 15, 30, 45 and 60 minutos. Se prepararon las correspondientes muestras de plasma, se liofilizaron, se resuspendieron en 0,5 ml D₂O (99.9%D) y se analizaron por ¹H NMR (360,13 MHz, 22°C, pH 7,2).

El compuesto 1 ($R^1=R^2=H$) desapareció más lentamente ($t_{1/2}=17$ min) del plasma que el compuesto 9 ($R^1=R^2=H$, R=Et, $t_{1/2}=6$ min). Las concentraciones

10

15

20

25

30

más altas de 1 (R¹=R²=H, 1,5 mM) y 9 (R¹=R²=H, R=Et, 6,6 mM) se alcanzaron, 2 min y 1 min después de la inyección, respectivamente. No se observaron síntomás de toxicidad durante el experimento.

Los paneles 2B-2F muestran las cinéticas de incorporación de 1 (R¹=R²=H) y 9 (R¹=R²=H, R=Et) en diferentes tejidos. En estos experimentos, se inyecto 1 mmol de 1 (R¹=R²=H) ó 9 (R¹=R²=H, R=Et) a tiempo 0 en la vena yugular derecha de ratas Wistar (machos adultos, 250-300 9 peso corporal). A los tiempos indicados, se sacrificaron los animales, se aislaron los órganos indicados, y se prepararon y analizaron extractos de metabolitos solubles en ácido perclórico (6%) y por ¹H NMR (360,13 MHz, 22°C, pH 7,2) según hemos descrito previamente (Gil, M.S., Cruz, F., Cerdán, S. y Ballesteros, P. (1992) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2, 1117-1722). Las concentraciones de los compuestos en cada tejido se determinaron comparando las intensidades de los protones imidazólicos del compuesto con la intensidad de la resonancia del TSP utilizado como referencia interna (1 mM), corrigiendo en todos los casos para la cantidad de tejido extraido.

El compuesto 1 (R¹=R²=H) se encontró en todos los tejidos analizados, alcanzando concentraciones relativamente altas (µmols/g peso corporal) en el cerebro (15,1), corazón (12,8), músculo esquelético (5,3), riñon (12,1) e hígado (2,2). Las concentraciones alcanzadas en los tejidos fueron superiores a las alcanzadas en plasma (panel 2A) indicando que 1 tiende a acumularse en los espacios intracelulares. Después de abandonar el plasma, las concentraciones más altas de 1 (R¹=R²=H) se encontraron primero en hígado (10 min), después en músculo esquelético y corazón (10-20 min) y finalmente en cerebro y riñón (30 min). En contraste, 9 (R¹=R²=H, R=Et), no se pudo detectar en el cerebro, se detectaron trazas en hígado (<0,2) y corazón (<0,5) y alcanzó concentraciones comparables a 1 (R¹=R²=H) en músculo esquelético (5,8) y riñón (13,9). Las trazas de 9 (R¹=R²=H, R=Et) encontradas en corazón e hígado reflejan muy probablemente la contaminación con sangre en estos órganos. Las concentraciones máximas de 9 (R¹=R²=H, R=Et) en tejidos se alcanzaron

WO 98/39664 PCT/ES98/00045

11

primero en el riñón (a los 10 min) y después en el músculo esquelético (a los 20 min). Tan sólo en el riñón **9** (R¹=R²=H, R=Et) alcanza una concentración similar a la detectada en plasma, indicando que este compuesto es un buen marcador del espacio extracelular especialmente en el cerebro, hígado y corazón. Por ultimo **9** (R¹=R²=H, R=Et) alcanzó su concentración más alta en riñón más rápidamente que **1** (R¹=R²=H), pero en el músculo esquelético ocurrió lo contrario.

Imagenes de pH por Resonancia Magnética; ¹H CSI y ¹H SI.

5

10

15

20

25

30

La Figura 3 muestra la obtención de una imagen de pH utilizando ¹H CSI (imagen de desplazamiento químico) y el compuesto 9 (R1=R2=H, R=Et). Esta es, hasta lo que conocemos, la primera imagen de la distribución espacial del pH tomada con técnicas de CSI y una sonda molecular extrínseca. En este experimento, se colocó una solución 0,3M de 9 (R1=R2=H, R=Et; pH 7,4) en aqua en un tubo de RMN de 5mm que contenía en su interior un capilar de 2mm de diámetro lleno de agua. Se obtuvo una imagen de RMN de un corte coronal perpendicular al eje mayor del tubo, utilizando una sonda comercial de microimagen (Bruker Analistische Messtechnich, Rheinstetten, Alemania) provista de un inserto para tubos de 5 mm y un dispositivo de gradientes magnéticos ortogonales protegidos activamente contra corrientes de Eddy. Las condiciones de adquisición fueron, 8.4 Teslas de Campo Magnético estatico (B₀), 22°C de temperatura, 500 μ de sección perpendicular al eje z, excitación selectiva de la resonancia H2 de 9 (R1=R2=H, R=Et; 8,04 ppm) mediante una secuencia de eco de espín y codificación en imagen del eco resultante utilizando un gradiente de lectura constante (eje x) y un gradiente de fase variable (eje y), respectivamente (Browun, T.R., Kincaid, B.M. y Ugurbil, K. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 79:3523:3526; Maudsley, A.A., Hilal, S.K., Perman, W.H. y Simon, H.E. (1983). J. Mag. Res. 66:283-294) La imagen de desplazamiento químico muestra que la resonancia H2 esta presente exclusivamente en la porción más externa del tubo, sin contaminar

10

15

20

25

30

apreciablemente el espacio ocupado por el capilar coaxial que contiene exclusivamente agua. Dado que la distribución de la resonancia H2 es uniforme en el espacio periférico al capilar, es posible concluir que el pH de 7.4 revelado por la resonancia H2 de 9 (R¹=R²=H, R=Et) es homogéneo en toda la solución. Este resultado demuestra que es posible obtener una imagen de aquellas regiones de una muestra que muestran idéntico pH utilizando métodos de CSI y la resonancia H2 del compuesto 9 (R¹=R²=H, R=Et). Se pueden obtener resultados similares utilizando las otras sondas indicadas en el esquema 1 ó extender estos resultados a nuevas sondas conteniendo ¹ºF mediante ¹ºF CSI.

Finalmente, llevamos a cabo experimentos de imagen espectroscópica (SI) de 9 (R¹=R²=H, R=Et) en ratones portadores de tumores. Se inocularon subcutáneamente 0,5 ml de tampón Hank's conteniendo 1X10⁶ células de Fibrosarcoma inducido por radiación (RIF1) en los flancos de ratones C3H/Hen de 6-8 semanas de edad. Se dejaron crecer los tumores durante 1-2 semanas hasta alcanzar volúmenes de 400-900 mm³, determinados con medidas en tres direcciones ortogonales del tumor. Se prepararon los ratones para el experimento de imagen espectroscópica con una inyección intraperitoneal de 9 (R¹=R²=H, R=Et; 0,15 ml de una solución 1M pH=7,0). Dos a cinco minutos después de la inyección, se anestesiaron los ratones con cetamina (50 mg/Kg) y acepromazina (5mg/Kg), inmovilizándolos en una camilla para animales con una bobina solenoidal de ¹H apropiada para su utilización en el imán horizontal de 4,7 Teslas. Se ayudó a mantener la temperatura corporal del ratón anestesiado mediante una bolsa de agua caliente recirculante colocada debajo del ratón.

La camilla para animales y la bobina de ¹H están diseñadas para espectroscopía e imagen de ¹H en general y no contienen características específicas para la utilización de los derivados de imidazol como sonda de pH extracelular. Se pueden utilizar otros diseños y sondas equivalentes con igual facilidad para este propósito. La imagen espectroscópica se adquirió utilizando la secuencia BASSALE (Shungu, D.C. y Glickson, J.D. (1994) *Mag. Res. in Med.* 32, 277-84; Shungu, D.C. y Glickson, J.D. (1993) *Mag. Res. in Med.* 30, 661

-71).

10

15

20

25

La imagen espectroscópica (SI) mostrada en la Figura 4 se obtuvo de voxels de tamaño 2x2x4 mm³. Cada espectro (x1,y1) hasta (x12,y12) representa un voxel diferente en el tumor. La parte superior (12 ppm-5,5 ppm) muestra la distribución espacial de una de las resonancias de los protones imidazólicos de 9 (R¹=R²=H, R=Et; ver voxels x10-y8, x11-y8,x10-y7 y x11-y7). La parte inferior muestra la distribución de la resonancia del agua (a 4,7 ppm) en los mismos voxels.

Se puede calcular un valor para el pH en cada voxel a partir de los espectros de la parte superior y las curvas de titulación de los desplazamientos químicos de 9 (R¹=R²=H, R=Et) frente a pH (20, ver Figura 1) Dado que los desplazamientos químicos de este protón no son iguales en cada voxel y que 9 (R¹=R²=H, R=Et) permanece en el espacio extracelular, la variación entre los diversos voxels del desplazamiento químico de 9 refleja heterogeneidad de pH en las diversas zonas del tumor.

En resumen, los resultados presentados en esta patente demuestran un nuevo procedimiento para obtener imágenes de la distribución del pH extracelular en muestras biológicas, no transparentes, utilizando una nueva serie de indicadores extrínsecos y métodos de Resonancia Magnética. Mostramos que algunos de estos indicadores no son tóxicos y permiten determinaciones de pH mediante métodos de imagen de desplazamiento químico (CSI) o imagen espectroscópica (SI) en volúmenes de hasta 0,2 µl con resoluciones de pixel de 20µx20µ en un campo magnético de 8,4 Teslas. Los resultados de la aplicación de esta metodología *in vivo* en ratones portadores de tumores han proporcionado las primeras evidencias de heterogeidad de pH *in situ* en tumores RIF-1 implantados en ratones C3H/Hen.

10

15

20

25

14

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LOS DIBUJOS.

Figura 1. Curva de titulación del compuesto 9 (R¹=R²=H, R=Et) en D₂O (99,9%D). Los desplazamientos químicos (δ) del protón H2 se midieron por ¹H MRS (360,13 MHz, 22°C) con respecto a TSP interno a 0 ppm. Las medidas de pH no están corregidas para el efecto del D.

Figura 2. Concentraciones en plasma y tejidos de 1 (R¹=R²=H), puntos blancos) y 9 (R¹=R²=H, R=Et, puntos negros) después de la inyección intravenosa de 1 mmol de cada compuesto en ratas macho Wistar. A: Plasma, B: Hígado, C: Corazón, D: Músculo esquelético (gastrocnemio izquierdo), E: Cerebro y F: Rinón.

Figura 3. Imagen de pH 7.2 de un objeto modelo. Esta imagen muestra las regiones del especimen que tienen pH=7,2. El objeto es un tubo de RMN de 5 mm de diámetro con una solución 0,3M de 9 (R1=R2=H, R=Et, pH 7,2) que contiene insertado un capilar de 2mm de diámetro con agua destilada. La imagen se obtuvo a 8.4 Teslas utilizando una secuencia convencional de eco de spin con excitación selectiva de la señal del protón H2 (8,08 ppm) en una secci6n coronal con 500µ de espesor (eje z). En el dominio del tiempo se recogieron 256 ecos, conteniendo 256 puntos/eco cada uno en presencia de un gradiente constante de lectura (eje x) y de 256 incrementos del gradiente de fase (eje y), respectivamente. La imagen se obtuvo después de una transformación de Fourier bidimensional de la matriz resultante (256x256) utilizando calculo de magnitud. En la adquisición se empleó una sonda comercial Bruker equipada con gradientes protegidos activamente y un inserto de 5mm. El tamaño del voxel es (x,y,z) 20μx20μx500μ (0.2 μL de volumen) conteniendo 60 nmols de 9 (R1=R2=H, R=Et). Nótese que el capilar interno que contiene agua (a 4.8 ppm) no muestra sangrado de señal H2. El tiempo de adquisición fue aproximadamente 60 minutos.

Figura 4. Imágenes espectroscópicas (SI) de la distribucion de 9 (R¹=R²=H, R=Et; A) y agua (B) en un tumor RIF-1 implantado en ratones C3H/Hen. La imagen se obtuvo a 4,7 Tesla (Shungu, D.C. y Glickson, J.D. (1994) Mag. Res. in Med. 32, 277-84 y Shungu, D.C. y Glickson, J.D. (1993) Mag. Res. in Med. 30, 661 -71).

- 10

5

15

20

25

REIVINDICACIONES

- 1. Procedimientos para la obtención de imágenes y espectros del pH extracelular por Resonancia Magnética con indicadores extrínsecos conteniendo ¹H ó ¹⁹F.
- 2. Procedimientos según la reivindicación 1, caracterizados por su utilización en fisiopatología de microorganismos, orgánulos subcelulares, células aisladas ó en cultivo, órganos perfundidos, animales intactos y seres humanos.

10

5

3. Procedimientos según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizados por la utilización de la serie de compuestos 1-9 del esquema 1 como indicadores extrínsecos y ¹H MRS, ¹H MRI o cualquier combinación de estos métodos; ó ¹⁹FMRS y ¹⁹FMRI si se incluye ¹⁹F como sustituyente en el indicador extrínseco.

15

20

- 4. Procedimientos según las reivindicaciones 1, 2, 3, caracterizados por sus aplicaciones de diagnóstico clínico en distrofias musculares, patologías isquémicas y en la evaluación de la respuesta a diversas terapias; en transformación tumoral benigna o maligna, metástasis y en la evaluación de la respuesta tumoral a terapias; en fisiología y medicina del ejercicio y del deporte; o por extensión en cualquier otra situación fisiológica, patológica o terapéutica que involucre modificaciones en el pH intra y extracelular.
- 5. Procedimientos según las reivindicaciones 1, 2, 3 y 4 adaptados para la medida del pH intracelular y obtención de imágenes del pH intracelular mediante el uso de indicadores del esquema 1 modificados para permanecer atrapados en el espacio intracelular.

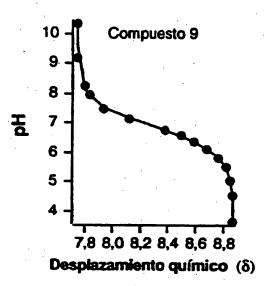


Figura 1

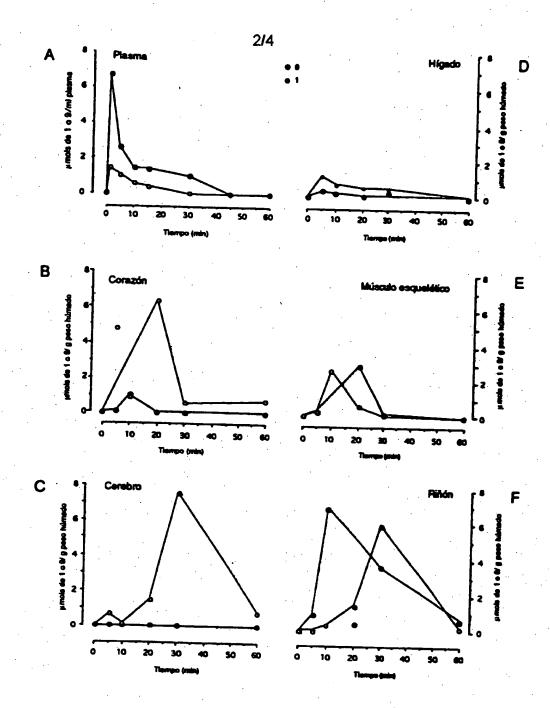


Figura 2

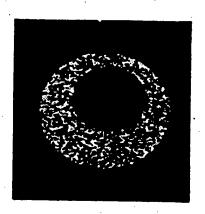
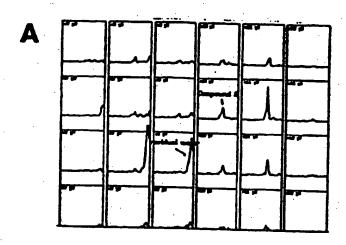


Figura 3



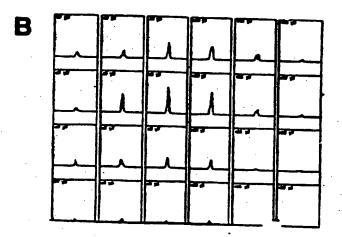


Figura 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/ES 98/00045

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC6 G01R33/48, A61B5/055

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC6 G01R33/46, 48; A61B5/055; COVD233. ECLA G01R33/48G

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC	, WPIL, PAJ, CIBEPAT		
C. DOCUN	MENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where ap	propriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X P,A	US - 5639906 - A (London et al column 3, line 6-column 15, li column 35, line 35-column 44,	ne 40;	1 2,4,5
X A	EP - 0368429 - A (SCHERING A.C page 3, line 1 - page 11, line page 46, line 15-48	a.) 16:May 1990 (16.05.90) : 11;	1
Α	WO - 9517910 - A (BRACCO S.P.A (06.07,95) claims 1,9	.) 6 July 1995	1,2
A	EP - 0095124 - A (BRUKER MEDIZ 30 November 1983 (30.11.83) claim 2; page 12, line 1 -25	INTECHNIK)	1,2
Α	WO - 9604249 - A (SRI INTERNAT 15 February 1996 (15.02.96) see the whole document	TIONAL)	1,3,4
Special "A" docume to be of "E" earlier of cited to special "O" docume means "P" docume the prior	categories of cited documents: In defining the general state of the art which is not considered particular relevance In defining the general state of the art which is not considered particular relevance In which may throw doubts on priority claim(s) or which is establish the publication date of another citation or other reason (as specified) Interesting to an oral disclosure, use, exhibition or other than the published prior to the international filing date but later than rity date claimed	IX See patent family annex. "T" later document published after the interdate and not in conflict with the applithe principle or theory underlying the "X" document of particular relevance; the considered novel or cannot be consisted when the document is taken alor "Y" document of particular relevance; the considered to involve an inventive combined with one or more other such being obvious to a person skilled in the "&" document member of the same patents.	cation but cited to understand invention claimed invention cannot be dered to involve an inventive ince claimed invention cannot be step when the document is documents, such combination the art
	actual completion of the international search	Date of mailing of the international sea	·
	June 1998 (10.06.98) nailing address of the ISA/	Authorized officer	
Name and n	S.P.T.O.		

Telephone No.

Facsimile No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES 98/00045

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
A	WO - 9303771 -A (MALLINCKRODT MEDICAL) 4 March 1993 (04.03.93)	
٠.		
		•
		.
•		
	·	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT Information on patent family members

International Applicati n No PCT/ES 98/00045

Patent document cited in search report	Publication date	Patent familiy member(s)	Publication date
US 5639906	17/06/97		

EP 0368429	16/05/90	FI 894714	08/04/90
		PT 91907	30/04/90
:		DK 496189	08/04/90
·	•	US 5130119	14/07/92
•	,	IE 64779	06/09/95
		ES 2061959	16/12/94
		EP 0579261	19/01/94
,		EP 0368429	16/05/90
		DE 58906941	24/03/94
		DE 3834704	07/06/90
·		CA 2000276	07/04/90
·		AU 4269389	21/06/90
•		AU 633850	11/02/93
•		JP 2270832	05/11/90
WO 9517910	06/07/95	IT 1265440	22/11/96
		EP 0735900	09/10/96
		JP 9502734	18/03/97
EP 0095124	30/11/83	DE 3219832	01/12/83
	,	AU 1490083	01/12/83
		AU 551305	24/04/86
		JP 58218950	20/12/83
WO 9604249	15/02/96	US 5721265	24/02/98
		EP 0775117	28/05/97
		CA 2196900	15/02/96
WO 9303771	04/03/93	US 5248498	28/09/93
		EP 0599946	08/06/94
		CA 2113996	04/03/93
		AU 2406292	16/03/93
		AU 657789	23/03/95
		JP 6509802	02/11/94

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

S'olicitud internacional n° PCT / ES 98 / 00045

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁶ G01R33/48, A61B5/055 De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BUSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)

CIP6 G01R33/46, 48; A61B5/055; C07D233. ECLA G01R33/48G

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, WPIL, PAJ, CIBEPAT

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria*	Documentos citados, con indicación, si procede, de los pasajes relevantes	Nº de las reivindicaciones a que se refieren
P, X P, A	US - 5639906 - A (London et al) 17.06.97 *Col 3, lin 6 - Col 15, lin 40; Col 35, lin 35 - Col 44, lin 49*	2, 4, 5
X A	EP - 0368429 - A (SCHERING A. G.) 16. 05. 90 *Pg 3, lin 1 - Pg 11, lin 11; Pg 46, lin 15 - 48*	2, 4, 5
A	WO - 9517910 - A (BRACCO S. P. A.) 06.07.95 *Reivindicaciones 1, 9*	1,2
A	EP - 0095124 - A (BRUKER MEDIZINTECHNIK) 30.11.83 *Reivindicación 2; Pg 12, lin 1 - 25 *	1,2
A	WO - 9604249 - A (SRI INTERNATIONAL) 15.02.96 * Ver el documento completo *	1,3,4

		and the second s	
	· · ·		
-IX	En la continuación del recuadro C s	e missionen atros	documentos
-	En la continuación del recuadro C s	e iciacionam odos	docamentos

s Los documentos de familia de patentes se indican en anexo

- Categorias especiales de documentos citados:
- "A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.
- "E" documentos anterior publicado en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.
- "L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).
- documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.
- documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.
- documento ultirior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
- "X" documento particulamente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento ais:adamente considerado.
- documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evident: para un experto en la materia.
- "&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

10 de Junio de 1998

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

1 8 JUN 1998

1 8. 06, 98)

action and answers

...

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.
C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.

nº de fax +34 1 3495304

Funcionario autorizado

Antonio Cárdenas Villar nº de teléfono +34 1 349 53 93

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Formulario PCT/ISA/210 (continuación de la segunda hoja) (julio 1992)

Solicitud internacional n°
PCT/ ES 98 / 00045

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES					
Categoria *	Documentos citados, con indicación, si procede, de los pa ajes relevantes	Nº de las reivindicaciones a que se refieren			
A	WO - 9303771 - A (MALLINCKRODT MEDICAL) 04.03.93				
·					
• 1					
•					

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ ES 98 / 00045

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
US 5639906	17/06/97		
<u> </u>	· · · ·		·
EP 0368429	16/05/90	FI 894714	08/04/90
		PT 91907	30/04/90
		DK 496189	08/04/90
		US 5130119	14/07/92
	•	IE 64779	06/09/95
	•	ES 2061959	16/12/94
		EP 0579261	19/01/94
		EP 0368429	16/05/90
		DE 58906941	24/03/94
		DE 3834704	07/06/90
	e grande de	CA 2000276	07/04/90
•		AU 4269389	21/06/90
•		AU 633850	11/02/93
		JP 2270832	05/11/90
WO 9517910	06/07/95	IT 1265440	22/11/96
,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,	•	EP 0735900	09/10/96
	•	JP 9502734	18/03/97
EP 0095124	30/11/83	DE 3219832	01/12/83
		AU 1490083	01/12/83
		AU 551305	24/04/86
	• .	JP 58218950	20/12/83
WO 9604249	15/02/96	US 5721265	24/02/98
,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,		EP 0775117	28/05/97
		CA 2196900	15/02/96
WO 9303771	04/03/93	US 5248498	28/09/93
,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,,		EP 0599946	08/06/94
		CA 2113996	04/03/93
•	•	AU 2406292	16/03/93
		AU 657789	23/03/95
			02/11/94